

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus hingga bulan Desember 2016 bertempat di Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Optik Jurusan Biologi Fakultas Sains Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Biofisika Jurusan Fisika Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya

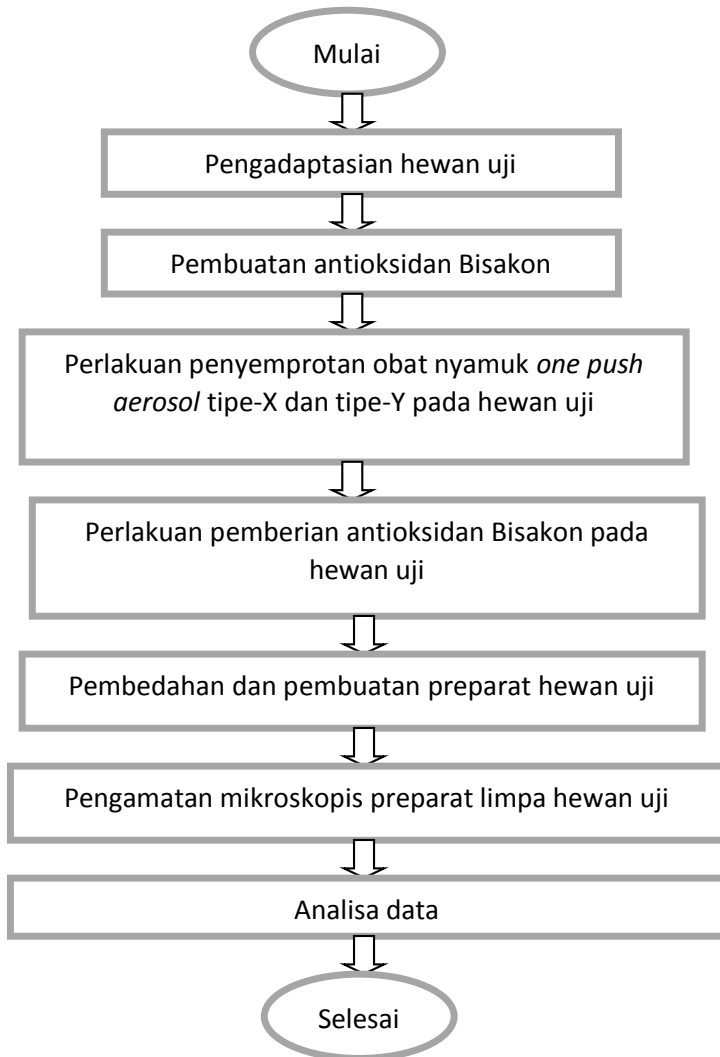
#### **3.2 Alat Dan Bahan**

Alat penelitian yang digunakan adalah timbangan digital, gelas ukur, pipet, mikro pipet, botol kaca kecil, spatula, kandang mencit, tempat makan mencit, tempat minum mencit, masker, sarung tangan, sonde, chamber, stopwatch, alat-alat pembedahan, gelas tempat menyimpan organ, papan bedah, jarum, cawan petri, mikroskop, alat-alat preparasi, *slide glass*, mikrotum, *covering glass*. Bahan-bahan penelitian yang digunakan adalah ekstrak binahong, ekstrak sirsak, ekstrak cengkeh, ekstrak bawang lanang, ekstrak ginseng, aquades, kertas saring, aluminium foil, tisu kertas label, sekam kayu, pelet, air, mencit (*Mus musculus*) jantan berumur 2-3 bulan, obat nyamuk one push aerosol tipe X (25 % transfluthrin), obat nyamuk aerosol tipe Y (21,3 % transfluthrin), alkohol 70 %, formalin, NaCl (0,9%), xylol, parafin dan pewarna HE.

#### **3.3 Tahapan Penelitian**

Tahap pertama adalah pengadaptasian hewan penelitian yakni mencit. Tahap kedua adalah pembuatan antioksidan Bisakon dengan dosis bervariasi. Kemudian tahap ketiga adalah perlakuan memberi semprotan obat nyamuk *one push aerosol* tipe-X dan tipe-Y. Tahap keempat adalah pemberian antioksidan Bisakon terhadap hewan uji. Tahap kelima adalah pembedahan mencit dan pembuatan preparat organ limpa hewan penelitian ini. Tahap keenam adalah pengamatan

kerusakan preparat organ limpa mencit kerusakannya dengan mikroskop. Tahap ketujuh adalah penganalisaan kerusakan organ limpa mencit. Tahapan-tahapan penelitian dapat digambarkan dalam diagram alur Gambar 3.1 :



**Gambar 3.1** Diagram Tahapan Penelitian

### 3.4 Cara Kerja

#### 3.4.1 Pengadaptasian hewan uji coba

Pada penelitian ini, hewan uji yang digunakan adalah mencit sebanyak 90 ekor. Sebelum diberi perlakuan, mencit akan terlebih dahulu diadaptasikan dalam kandang. Kandang ini sekaligus diisi tempat makan dan tempat minum mencit. Adaptasi hewan uji dilakukan selama tujuh hari.

#### 3.4.2 Pembuatan Antioksidan Bisakon

Data dosis, awalnya diperoleh dari dosis harian manusia yang ada pada kemasan ekstrak. Agar dosis yang diberikan kepada mencit sesuai, maka diterapkan konversi dari dosis manusia ke dosis mencit. Hal ini bertujuan agar dosis yang diberikan tidak melebihi kemampuan mencit untuk menyerapnya, sehingga tidak menimbulkan dosis yang berlebihan atau *overdose*. Konversi dan perhitungan dosis dari manusia ke mencit dapat dilihat melalui tabel di dalam lampiran. Setelah melalui perhitungan maka dapat diketahui dosis masing-masing ekstrak yang sesuai untuk kebutuhan mencit per hari pada Tabel 3.1.

**Tabel 3.1** Dosis Antioksidan untuk Mencit

<b>Dosis</b> Antioksidan	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Binahong</b>	6,8 mg	7,3 mg	7,8 mg	8,3 mg	8,8 mg
<b>B. Lanang</b>	6,8 mg	7,3 mg	7,8 mg	8,3 mg	8,8 mg
<b>Cengkeh</b>	6,8 mg	7,3 mg	7,8 mg	8,3 mg	8,8 mg
<b>Srsak</b>	0,95 mg	1,45 mg	1,95 mg	2,45 mg	2,95 mg
<b>Ginseng</b>	4,2 mg	4,7 mg	5,2 mg	5,7 mg	6,2 mg
<b>Total</b>	<b>25,55 mg</b>	<b>28,05 mg</b>	<b>30,55 mg</b>	<b>33,05 mg</b>	<b>35,55 mg</b>

### 3.4.3 Perlakuan terhadap Hewan Uji

Sebanyak 90 mencit dibagi menjadi 18 kelompok perlakuan. Setiap kelompok memiliki jumlah mencit lima ekor. Dari 18 kelompok dibagi menjadi 3 kelompok besar seperti pada Tabel 3.2. Kelompok besar pertama, kelompok kontrol tanpa semprotan obat nyamuk (O--). Kelompok besar kedua adalah kelompok dengan tiga kali semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-X (X--). Kelompok ketiga adalah kelompok dengan tiga kali semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-Y (Y--). Identitas kelompok terdiri atas dua huruf dan satu angka. Huruf pertama menerangkan kelompok besar diatas. Huruf kedua dan angka menunjukkan dosis antioksidan yang diberikan. Kelompok yang tidak diberi antioksidan memiliki identitas (-A0), kelompok yang diberi dosis pertama antioksidan memiliki identitas (-A1), kelompok yang diberi dosis kedua antioksidan memiliki identitas (-A2) dan seterusnya.

**Tabel 3.2** Pembagian Kelompok Mencit

No	Identitas Kelompok	Jumlah Semprotan	Dosis Antioksidan	Keterangan
Kelompok besar tanpa semprotan (O--)				
1	Kontrol (OA0)	0	Dosis 0	Tanpa antioksidan & tanpa semprotan obat nyamuk
2	Kontrol Antioksidan (OA1)	0	Dosis 1	Perlakuan dengan antioksidan dosis pertama & tanpa semprotan obat nyamuk

Tabel bersambung

Lanjutan tabel

<b>3</b>	Kontrol Antioksidan (OA2)	0	Dosis 2	Perlakuan dengan antioksidan dosis kedua & tanpa semprotan obat nyamuk
<b>4</b>	Kontrol Antioksidan (OA3)	0	Dosis 3	Perlakuan dengan antioksidan dosis ketiga & tanpa semprotan obat nyamuk
<b>5</b>	Kontrol Antioksidan (OA4)	0	Dosis 4	Perlakuan dengan antioksidan dosis keempat & tanpa semprotan obat nyamuk
<b>6</b>	Kontrol Antioksidan (OA5)	0	Dosis 5	Perlakuan dengan antioksidan dosis kelima & tanpa semprotan obat nyamuk
Kelompok besar dengan tiga kali semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-X (X--)				
<b>7</b>	Semprotan tipe-X (XA0)	X 3	Dosis 0	Tanpa antioksidan dan dengan tiga semprotan obat

Tabel bersambung

Lanjutan tabel				nyamuk one push aerosol tipe-X
8	Semprotan tipe-X (XA1)	X 3	Dosis 1	Perlakuan dengan antioksidan dosis pertama dan dengan tiga semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-X
9	Semprotan tipe-X (XA2)	X 3	Dosis 2	Perlakuan dengan antioksidan dosis kedua dan dengan tiga semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-X
10	Semprotan tipe-X (XA3)	X 3	Dosis 3	Perlakuan dengan antioksidan dosis ketiga dan dengan tiga semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-X

Lanjutan tabel

<b>11</b>	Semprotan tipe-X  (XA4)	X 3	Dosis 4	Perlakuan dengan antioksidan dosis keempat dan dengan tiga semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-X
<b>12</b>	Semprotan tipe-X (XA5)	Y 3	Dosis 5	Perlakuan dengan antioksidan dosis kelima dan dengan tiga semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-X
Kelompok besar dengan tiga kali semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-Y (Y--)				
<b>13</b>	Semprotan tipe-Y (YA0)	Y 3	Dosis 0	Tanpa antioksidan dan dengan tiga semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-Y
<b>14</b>	Semprotan tipe-Y (YA1)	Y 3	Dosis 1	Perlakuan dengan antioksidan dosis pertama dan dengan tiga semprotan obat

<b>Lanjutan tabel</b>				nyamuk one push aerosol tipe-Y
<b>15</b>	Semprotan tipe-Y (YA2)	Y 3	Dosis 2	Perlakuan dengan antioksidan dosis kedua dan dengan tiga semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-Y
<b>16</b>	Semprotan tipe-Y (YA3)	Y 3	Dosis 3	Perlakuan dengan antioksidan dosis ketiga dan dengan tiga semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-Y
<b>17</b>	Semprotan tipe-Y (YA4)	Y 3	Dosis 4	Perlakuan dengan antioksidan dosis keempat dan dengan tiga semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-Y



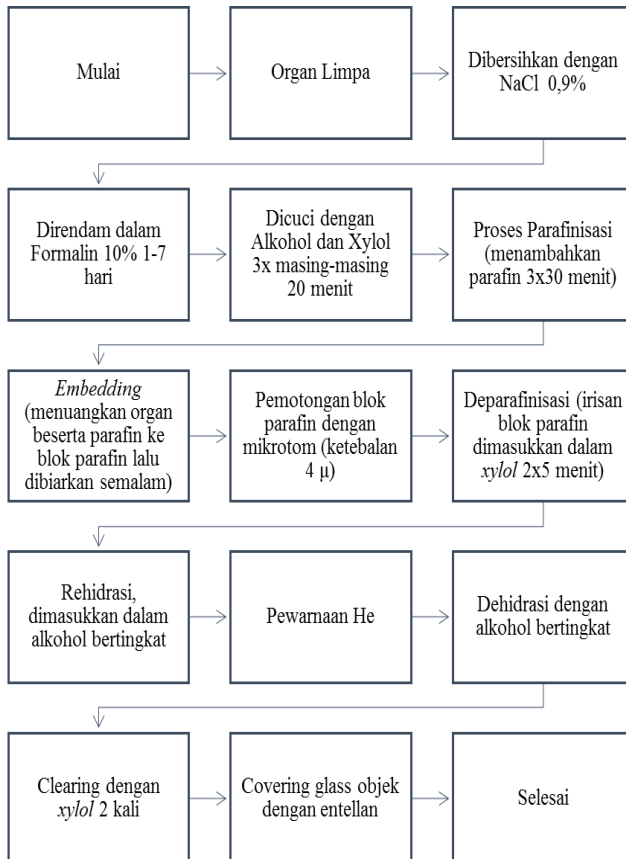
18	Semprotan tipe-Y (YA5)	Y 3	Dosis 5	Perlakuan dengan antioksidan dosis kelima dan dengan tiga semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-Y
----	------------------------	-----	---------	---

Penyemprotan pada hewan uji dilakukan sebanyak tiga kali semprotan obat nyamuk one push aerosol tipe-X dan tipe-Y. Pada penelitian yang dilakukan Sulistyowati (2016), menunjukkan bahwa pada jumlah tiga kali semprotan obat nyamuk tipe diatas sudah memberi kerusakan yang besar pada organ limpa. Penyemprotan dilakukan di dalam *chamber* kaca tertutup, setelah disemprot mencit dibiarkan selama dua puluh menit berada di tempat tersebut. Sedangkan pemberian antioksidan dilakukan dengan cara sonde atau melalui alat suntik tumpul.

#### 3.4.4 Pembuatan Preparat

Setelah setiap mencit melalui proses perlakuan, maka masing-masing mencit dibedah dan diambil organ limpanya. Organ ini kemudian diiris setipis dan sekecil mungkin untuk mewakili struktur keseluruhan. Tahapan selanjutnya adalah proses difiksasi, yakni proses perendaman irisan organ limpa ke dalam larutan formalin 10% dalam waktu lebih dari satu hari atau duapuluh empat jam. Selanjutnya adalah proses memasukkan preparat ke dalam larutan etanol 70%, kemudian ke larutan etanol 80% dan 90% masing-masing dalam waktu sekitar 30 menit. Tahap setelah ini adalah pelarutan dalam etanol 95% dan 96% masing-masing selama 30 menit dan dilakukan dua kali perendaman. Tahapan selanjutnya adalah perendaman preparat dalam xilol, metode ini bertujuan untuk menghilangkan etanol setelah dehidrasi selama tiga kali tiga puluh menit. Kemudian preparat dipindahkan ke paraffin cair yang diletakkan dalam wadah blok preparat. Selanjutnya adalah pemotongan preparat serta langsung ditempel di kaca objek. Setelah itu dipanaskan dengan suhu 40 derajat

Celsius hingga kering. Lalu direndam ke xilol murni selama sepuluh menit dan direndam masing-masing sepuluh menit dalam etanol 96%, 95%, 90%, 80% dan 70%. Setelah selesai, maka preparat dicuci dengan air dan dilakukan pewarnaan selama dua menit dengan hemaktosilin-eosin. Preparat lalu dibilas dengan air lagi dan dibiarkan dalam suhu kamar. Setelah kering maka harus ditutup dengan *object glass* dan kemudian diamati dengan perbesaran 1000, diagram alir ada pada Gambar 3.2.



**Gambar 3.2** Diagram Alir Pembuatan Preparat

### 3.4.5 Pengamatan mikroskopis preparat organ limpa mencit

Pengamatan preparat organ limpa mencit menggunakan mikroskop Binokuler Olympus CX 31. Pengamatan mikroskop organ limpa mencit dibagi menjadi 5 lapang pandang untuk setiap preparatnya. Lima lapang pandang ini meliputi bagian atas, bawah, tengah, kanan serta bagian kiri. Hasil pengamatan mikroskopis organ limpa yang telah didapatkan kemudian dihitung sel yang rusak dan normal. Sel rusak dihitung dari jumlah sel lisis dan sel limfosit. Kemudian dijadikan dalam bentuk presentase tingkat kerusakan organ limpa mencit dengan rumus:

$$\text{Persentase kerusakan total} = \frac{\text{Jumlah sel yang rusak}}{\text{Jumlah sel keseluruhan}} \times 100\%$$

### 3.4.6 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan melihat bentuk *trend* grafik antara dosis antioksidan Bisakon dengan persentase kerusakan organ limpa pada mencit. Lalu dibandingkan antara yang diberi perlakuan dengan obat anti nyamuk one push aerosol tipe X, tipe Y dan tanpa semprotan.

(Halaman ini sengaja dikosongkan)